

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-335953

(P2002-335953A)

(43) 公開日 平成14年11月26日 (2002. 11. 26)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テレポート (参考)
C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 1/20	A 4 B 0 1 8
// A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	Z 4 B 0 6 5
(C 1 2 N 1/20		C 1 2 R 1:245	
C 1 2 R 1:245)			

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願2001-144841 (P2001-144841)

(22) 出願日 平成13年 5 月15日 (2001. 5. 15)

(71) 出願人 000006699

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町 6 丁目 1 番 1 号

(72) 発明者 冠木 敏秀

東京都東村山市久米川町 5 - 6 - 19 - 202

(72) 発明者 ヨハン レネス

オランダ, フローニンゲン, 9731 ジェイジ  
ー, カミエウエッグ 57

(72) 発明者 パウキヤ ムルダー ボスマン

オランダ, エルデ, 9761 ケーディー, プロ  
クスタッケン 25

(74) 代理人 100090941

弁理士 藤野 清也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規乳酸菌株

(57) 【要約】

【課題】 胆汁酸耐性能及び浸透圧耐性能を有する乳酸菌株の提供。

【解決手段】 ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) を高濃度の抱合型胆汁酸混合液を含有する培地で段階的に培養し、生育した菌株を浸透圧の高い培地で段階的に培養し、生育した菌株を採取する。得られた菌株は、高い胆汁酸耐性能及び浸透圧耐性能を有しているので、胆汁酸濃度の高い腸管や浸透圧の高い環境においても生残性があり、宿主に対し乳酸菌の保健効果を示し、プロバイオティクス乳酸菌として有用である。ラクトバチルス・ガセリ SBT 10801 (FERM P-18137) が例示される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 胆汁酸耐性能及び浸透圧耐性能を有するラクトバチルス・ガセリ(*Lactobacillus gasseri*)菌株。

【請求項 2】 胆汁酸耐性能が、グリココール酸24%、グリコケノデオキシコール酸24%、グリコデオキシコール酸18%、タウロコール酸13%、タウロケノデオキシコール酸13%及びタウロデオキシコール酸8%からなる抱合型胆汁酸混合液を10mM以上含有する培地で生育可能なものであり、かつ浸透圧耐性能が、浸透圧2.2 Osmol/kg 10以上の培地で生育可能なものである請求項 1 記載の菌株。

【請求項 3】 ラクトバチルス・ガセリ(*Lactobacillus gasseri*) SBT10801 (FERM P-18137) である請求項 1 又は 2 記載の菌株。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、胆汁酸耐性能及び浸透圧耐性能を有するラクトバチルス・ガセリ(*Lactobacillus gasseri*)菌株に関する。

## 【0002】

【従来の技術】近年、生理効果を有する乳酸菌が注目されている。特に、生きた状態で腸管に到達し、宿主に対して有効な保健効果を示す乳酸菌は、プロバイオティクス乳酸菌と定義され、ビフィドバクテリウム属菌やラクトバチルス属菌等の乳酸菌が注目されている。そして、これらの乳酸菌に関しては、整腸効果や消化吸収能の改善、血清コレステロールの低減、抗腫瘍効果等数多くの保健効果について報告されている。

【0003】ところで、これらのプロバイオティクス乳酸菌が消化管内で有効に働き保健効果を発揮するには、生きたままの状態では消化管内に到達する必要がある。しかし、消化管内に到達するまでに、温度、pH、酸素、浸透圧、胃酸や胆汁酸等、プロバイオティクス乳酸菌にとって様々な生育阻害環境や生育阻害物質が存在している。したがって、プロバイオティクス乳酸菌を利用するに際しては、そのプロバイオティクス乳酸菌が生育阻害環境や生育阻害物質に対して耐性能を有しているか否かが重要である。

【0004】特に、プロバイオティクス乳酸菌を凍結乾燥する過程での急激な水分活性の変化により、あるいはプロバイオティクス乳酸菌を利用した製品を製造する過程での糖類や塩類等の添加により、プロバイオティクス乳酸菌は、浸透圧によるストレスを受ける。したがって、浸透圧耐性能を有することは、プロバイオティクス乳酸菌にとって有利で有用な性質の一つであるといえる。また、プロバイオティクス乳酸菌を摂取した場合、強い界面活性効果と細胞膜に直接作用する殺菌効果とを示す胆汁酸が腸管内に存在していて、大きな影響を与えられらるので、胆汁酸耐性能を有することは、プ 50

ロバイオティクス乳酸菌にとって有利で有用な性質の一つであるといえる。

【0005】なお、胆汁酸は、ヒトをはじめ多くの動物の肝臓で生成される物質である。肝臓でコレステロールから生成されたコール酸やケノデオキシコール酸等の胆汁酸は一次胆汁酸と呼ばれ、タウリンやグリシンと結合して抱合型胆汁酸となり、胆汁中に分泌される。そして、胆汁中に分泌された大部分の胆汁酸は、腸管から吸収されて肝臓へ戻り、再び胆汁中に分泌されるという腸肝循環を繰り返している。また、一次胆汁酸の中には、腸管内において腸内細菌の作用により脱水酸化され、デオキシコール酸やリトコール酸等の二次胆汁酸と呼ばれる胆汁酸に変換されるものもある。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、プロバイオティクス乳酸菌として利用が可能な菌株を取得するべく、鋭意研究を進めてきたところ、ラクトバチルス・ガセリ(*Lactobacillus gasseri*)に属する菌株の中から胆汁酸耐性能及び浸透圧耐性能を有するラクトバチルス・ガセリ(*Lactobacillus gasseri*)変異株を取得することに成功し、本発明を完成するに至った。したがって、本発明は、プロバイオティクス乳酸菌として保健効果が期待できる、胆汁酸耐性能及び浸透圧耐性能を有するラクトバチルス・ガセリ(*Lactobacillus gasseri*)の菌株を提供することを課題とする。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、胆汁酸耐性能及び浸透圧耐性能を有するラクトバチルス・ガセリ(*Lactobacillus gasseri*)の新規な菌株であり、例えば、グリココール酸24%、グリコケノデオキシコール酸24%、グリコデオキシコール酸18%、タウロコール酸13%、タウロケノデオキシコール酸13%及びタウロデオキシコール酸8%からなる抱合型胆汁酸混合液を10mM以上含有する培地で生育可能な胆汁酸耐性能を有するものであり、かつ浸透圧2.2 Osmol/kg以上の培地で生育可能な浸透圧耐性能を有するものである。この新規な菌株は、ラクトバチルス・ガセリ(*Lactobacillus gasseri*)の変異株であり、例えば、ラクトバチルス・ガセリ(*Lactobacillus gasseri*) SBT10801 (FERM P-18137) である。

【0008】本発明の胆汁酸耐性能及び浸透圧耐性能を有するラクトバチルス・ガセリ(*Lactobacillus gasseri*)菌株は、以下のようにして取得することができる。すなわち、ヒト糞便を、光岡の LBS寒天培地に塗末し、嫌気条件下、37°Cで3日間培養して得られるコロニーを分離する。そして、この菌株を Bergy's Manual of systematic bacteriology, vol.2(1986) に従って同定した結果、ラクトバチルス・ガセリ(*Lactobacillus gasseri*)の菌学的性質と一致した。しかも、ラクトバチルス・ガセリ(*Lactobacillus gasseri*)の基準株であるラクトバチルス・ガセリ(*Lactobacillus gasseri*) JCM1131と同

等の性質を有していた。これをラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) SBT0269と命名し、これを親株とし、グリココール酸24%、グリコケノデオキシコール酸24%、グリコデオキシコール酸18%、タウロコール酸13%、タウロケノデオキシコール酸13%及びタウロデオキシコール酸8%からなる抱合型胆汁酸混合液を5mM含有する培地に接種し、生育した菌株を分離する。そして、培地中に添加する抱合型胆汁酸混合液の濃度を段階的に高めて生育した菌株を分離し、最終的に抱合型胆汁酸混合液を10mM含有する培地で生育した菌株を分離し

て、胆汁酸耐性能を有するラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) の菌株を得る。  
【0009】次に、分離した胆汁酸耐性能を有するラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) の菌株を親株とし、浸透圧1.5 Osmol/kgの培地に接種し、生育した菌株を分離する。そして、培地の浸透圧を段階的に高めて生育した菌株を分離して、最終的に浸透圧2.2 Osmol/kgの培地で生育した菌株を分離して、胆汁酸耐性能を有すると共に浸透圧耐性能を有するラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) の菌株を得る。

【0010】このようにして得られる菌株は、胆汁酸耐性能及び浸透圧耐性能を有するラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) の変異株であり、ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) の新規な菌株である。本発明のラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) は、前記のようなヒト胆汁酸組成を参考にしてデザインされた抱合型胆汁酸混合物で生育可能であるから、ヒトの胆汁中で生育することができる。さらに、浸透圧 2.2 Osmol/kg 以上の培地で生育することができる。浸透圧2.2 Osmol/kgを塩化ナトリウム濃度に換算すると約1Mでシヨ糖濃度43%に相当する。従って、このような浸透圧を有する加糖タイプの発酵乳や漬物等の高浸透圧食品中でも充分生育することができる。

【0011】この菌株は、下記の菌学的性質を有しており、後記した理由からラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) に属する菌株であることが確認できたので、ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) SBT10801と命名され、工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P-18137として寄託されている。その菌学的性質は以下の通りである。

#### 【0012】A 形態的性状

1. 細胞の形：桿菌
  2. 胞子の有無：なし
  3. グラム染色：陽性
- B 培地上の生育状態

1. プレートカウントアガー培地上のコロニー形態：表面が滑らかな白色球状

#### 【0013】C 生理的性質

- 15°Cでの生育能：陰性  
45°Cでの生育能：陽性

アルギニンの分解性：陰性

生成した乳酸の型：DL

各種炭水化物の分解性 (陽性+、陰性-)

アミグダリン：+

アラビノース：-

セロビオース：-

フルクトース：-

ガラクトース：+

グルコース：+

10 ラクトース：+

グルコネート：-

マルトース：+

マンニトール：-

マンノース：+

ラムノース：-

リボース：-

ソルビトール：+

シュークロース：+

キシロース：-

20 【0014】上記の菌学的性質から、Bergey's Manual of systematic bacteriology, vol.2(1986) により同定すると、ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) SBT10801 (FERM P-18137) は、ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) の菌学的性質と一致した。このラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) SBT10801 (FERM P-18137) は、グリココール酸24%、グリコケノデオキシコール酸24%、グリコデオキシコール酸18%、タウロコール酸13%、タウロケノデオキシコール酸13%及びタウロデオキシコール酸8%からなる抱合型胆汁酸混合液を15mM含有する培地で生育可能なものであり、かつ浸透圧2.2 Osmol/kg以上の培地で生育可能なものであって、この点において標準のラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) と相違し、胆汁酸耐性能及び浸透圧耐性能を有するラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) の変異株である。

【0015】次に、実施例及び試験例を示し、本発明をさらに詳しく説明する。

【実施例1】胆汁酸及び浸透圧に対して、ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) の基準株であるラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) JCM1131と同等の耐性を有するラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) SBT0269を親株とし、グリココール酸24%、グリコケノデオキシコール酸24%、グリコデオキシコール酸18%、タウロコール酸13%、タウロケノデオキシコール酸13%及びタウロデオキシコール酸8%からなる抱合型胆汁酸混合液を5mM含有するMR S培地に接種し、37°Cで生育が認められるまで約120時間培養した。そして、5.5mM胆汁酸を含有する培地にこの培養液を5%接種し、同様に37°Cで約120時間培養した。このようにして、MR S培地に添加する抱合型胆汁酸混合液

の濃度を 0.5mM ずつ段階的に高めて生育した菌株を分離し、最終的に 10mM の抱合型胆汁酸混合液を含有する MRS 培地で生育した菌株を分離した。培養時間は、菌株の生育状況に応じて 240 時間まで培養を行った。なお、MRS 培地は、培地 1 リットル当たり、次の組成を有する；プロトースペプトン No.3 10g、ビーフエキストラクト 10g、イーストエキストラクト 5g、デキストロース 20g、ツィーン 80 1g、クエン酸アンモニウム 2g、酢酸ナトリウム 5g、硫酸マグネシウム 0.1g、硫酸マンガン 0.05g 及びリン酸第二カリウム 2g。

【0016】次に、分離した菌株を浸透圧 1.5 Osmol/kg の MRS 培地に接種し、生育した菌株を分離した。培地の浸透圧の調整は MRS 培地に塩化ナトリウムを添加することにより行った。そして、この培養液を浸透圧 1.6 Osmol/kg の MRS 培地に 5% 接種し、同様に 37°C で約 120 時間培養した。このようにして、MRS 培地の浸透圧を 0.1 Osmol/kg ずつ段階的に高めて生育した菌株を分離し、最終的に培地の浸透圧が 2.2 Osmol/kg の MRS 培地で生育した菌株を分離した。なお、培養時間は、菌株の生育状況に応じて 240 時間まで培養を行った。得られた変異株を、通常の MRS 培地で 3～7 代継代培養した後、10mM 胆汁酸を含む培地又は 1M 塩化ナトリウムを含む培地に、5% 接種して生育させた。このようにして得られたラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) の変異株は、胆汁酸耐性能及び浸透圧耐性能を有するラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) の新規な菌株であり、ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) SBT10801 (FERM P-18137) として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した。

【0017】なお、親株は抱合型胆汁酸混合液を 6mM 含有する培地で生育が阻害されるのに対し、変異株は抱合型胆汁酸混合液を 15mM 含有する培地で生育することができ、また、親株は浸透圧 1.6 Osmol/kg の培地で生育が阻害されるのに対し、変異株は浸透圧 2.2 Osmol/kg の培地で生育することができる。

【0018】

【試験例 1】実施例 1 で得られた胆汁酸耐性能及び浸透圧耐性能を有するラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) SBT10801 (FERM P-18137) を、培地中に添加する前記抱合型胆汁酸混合液の濃度を 0～20mM の範囲で段階的に高めて調製した MRS 培地に接種し、37°C で 8 時間培養して、それぞれの生育状態を比較した。また、親株のラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) SBT0269 及び基準株のラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) JCM1131 についても、同様にして、それぞれの生育状態を比較した。なお、生育状態は、培地の濁度を測定することにより評価した。すなわち、抱合型胆汁酸混合液無添加の MRS 培地で培養した場合の培養液の 660nm における OD 値を 100 とし、抱合型胆汁酸混合液添加のそれぞれの MRS 培地で培養した

場合の培養液の 660nm における OD 値を百分率で表した。その結果を図 1 に示す。

【0019】親株のラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) SBT0269 や基準株のラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) JCM1131 では、抱合型胆汁酸混合液を 5～6mM 含有する培地で生育が阻害されたのに対して、本発明のラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) SBT10801 (FERM P-18137) では、抱合型胆汁酸の濃度が高くなるにつれ生育状態は悪くなるものの、抱合型胆汁酸混合液を 15mM 含有する培地でも生育できることが判った。

【0020】

【試験例 2】実施例 1 で得られた胆汁酸耐性能及び浸透圧耐性能を有するラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) SBT10801 (FERM P-18137) を MRS 培地で培養した後、遠心分離して菌体を回収した。そして、食塩で浸透圧 2.2 Osmol/kg に調整した MRS 培地に回収した菌体を懸濁して 10°C で保存し、経時的にプレートカウント法で生菌数を測定して、生育状態を比較した。また、親株のラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) SBT0269 及び基準株のラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) JCM1131 についても、同様にして、それぞれの生育状態を比較した。その結果を図 2 に示す。親株のラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) SBT0269 や基準株のラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) JCM1131 では、保存開始 21 日後で生菌数が  $10^6$  cfu/ml 以下に減少したのに対して、本発明のラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) SBT10801 (FERM P-18137) では、保存開始 21 日後で生菌数が  $10^6$  cfu/ml であり、生菌数の減少は殆ど見られなかった。

【0021】

【発明の効果】本発明のラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) SBT10801 (FERM P-18137) は、高い胆汁酸耐性能及び浸透圧耐性能を有しているので、胆汁酸濃度の高い腸管内や浸透圧の高い環境下において高い生残性が期待でき、プロバイオティクス乳酸菌として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 試験例 1 におけるラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) の各菌株の生育状態を示す。

【符号の説明】

黒 丸：SBT10801

黒三角：SBT0269

黒四角：JCM1131

【図 2】 試験例 2 におけるラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasser* i) の各菌株の生菌数を示す。

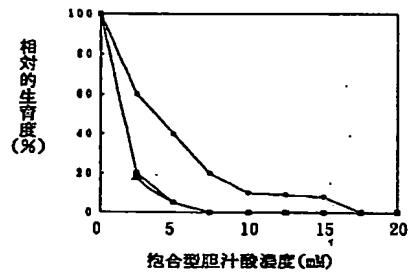
【符号の説明】

黒 丸：SBT10801

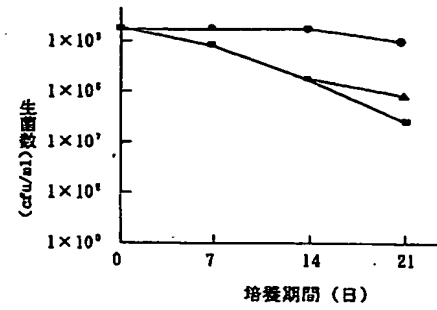
黒三角：SBT0269

黒四角：JCM1131

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 クラースカ ロック  
オランダ, フローニンゲン, 9741ジーエイ  
チ, イッペンラーン 162

Fターム(参考) 4B018 MD86 ME04 ME08 ME11 MF13  
4B065 AA30X AC07 AC20 BA23  
BB08 BB22 CA42 CA44